

Research Report

## Uji viabilitas flavonoid ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) terhadap sel fibroblas BHK-21

(Viability assay of flavonoid mangosteen pericarp extract (*Garcinia mangostana* L.) toward BHK-21 fibroblast cell)

Rizka Dwi Nur Vitria<sup>1</sup>, Tamara Yuanita<sup>2</sup>, Nirawati Pribadi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Strata -1 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

<sup>2</sup>Staf Pengajar Departemen Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

### ABSTRACT

**Background:** *Garcinia mangostana* L is tropical fruit that can be found in forest of Southeast Asian countries. *Garcinia mangostana* ) is alternative medicine because it have antioxidant, antibacterial, anti inflammatory and antitumor. *Garcinia mangostana* used as herbal materials due to containing important material such as mangostine, tannin, xanthone and flavonoid. Flavonoid has reported to have antioxidant, antiviral, antibacterial and anti inflammatory that effective as root canal irrigation alternative medicine. Viability assay was one of the biocompatibility test conducted to determine the effect of flavonoid on cell before used as herbal drugs material. **Purpose:** this study was aimed to knowing the concentration of extract flavonoids of mangosteen pericarp that is able to maintain the viability of fibroblasts BHK-21 cells. **Method:** this study was design as post test only control group laboratory experiment. *Garcinia mangostana* pericarp was extracted using maceration method with 96% ethanol solvent and flavonoid was took from extract using acetone benzene. Before the viability test, flavonoid mangosteen pericarp extract was made in a series concentration by method of dilution with into 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.56%, 0.78% and 0.39% concentration. Viability was observed after 24 hours using MTT assay technique. Viable cell were measured by optical density of their MTT absorbency, and observed by ELISA reader. **Result:** this study showed that he extract at concentrations of 100%, 50%, and 25% have false positive result because the value of absorbency was high but many of the fibroblast cell were died. At concentration 12.5% and 6.25% had viability cell values below 50% from control cell. At concentration 3.125% and 1.56% had had viability cell values almost same with the control cell. And at concentration 0.78% and 0.39% had viability cell values more than control cell. **Conclusion:** It can be conclude that the flavonoid mangosteen pericarp extract can maintained the viability of BHK-21 fibroblast cell at a concentration 3.125% and 1.56%.

**Keywords :** *Garcinia mangostana*, viability, BHK-21 fibroblast cell

Korespondensi (correspondence): Rizka Dwi Nur Vitria, Bagian Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Prof. Moestopo 47 Surabaya 60132, Indonesia. E-mail: uarizk@gmail.com.

### PENDAHULUAN

Perawatan saluran akar merupakan perawatan pada penyakit atau cedera pada jaringan pulpa dan jaringan periapikal yang bertujuan untuk mempertahankan gigi selama mungkin didalam mulut. Perawatan saluran akar dapat dibagi atas tiga tahap utama yaitu: preparasi biomekanis saluran akar atau pembersihan dan pembentukan (*cleaning and*

*shaping*), *dressing* dan obturasi saluran akar. Tindakan cleansing dan shaping harus disertai irigasi saluran akar agar debris dan jaringan nekrotik mudah dibersihkan.<sup>1</sup>

Larutan irigasi saluran akar yang ideal sebaiknya bersifat antibakteri, spektrum luas, mampu menghilangkan jaringan nekrotik atau debris, memiliki ketegangan permukaan rendah, mampu mensterilisasi saluran akar,

mencegah/ menghilangkan *smear layer*, menginaktivasi endotoksin serta dapat digunakan sebagai pelumas, tidak toksik dan biokompatibel terhadap jaringan sekitarnya.<sup>2</sup>

Bahan kimia irigasi yang sering digunakan dalam perawatan saluran akar adalah *sodium hypochlorite* (NaOCl) 2,5%. Namun, jika *sodium hypochlorite* berkontak dengan jaringan lunak yang vital dapat menjadi sangat sitotoksik, bersifat destruktif jika masuk ke jaringan periradikular dapat menyebabkan rasa sakit, perdarahan jaringan periapikal serta pembengkakan (inflamasi).<sup>3</sup> Adanya efek samping bahan kimia irigasi saluran akar seperti *sodium hypochlorite*, maka perlu dipertimbangkan bahan alternatif lain irigasi saluran akar dari bahan alam. Salah satu bahan alam yang dapat digunakan sebagai bahan dasar irigasi saluran akar adalah flavonoid. Karena, dari hasil penelitian secara *in vitro* maupun *in vivo* flavonoid menunjukkan aktivitas biologis dan farmakologis sebagai antioksidan, anti-viral, anti-tumor, anti-inflamasi, penghambatan enzim bakteri, antimikroba, serta anti alergi.<sup>4</sup>

Salah satu tumbuhan yang mengandung flavonoid ialah kulit buah manggis. Buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) merupakan tanaman tropis yang banyak ditemukan di berbagai negara khususnya hutan tropis di Asia Tenggara yang mempunyai kemampuan sebagai antioksidan, antimikroba, sitoprotektif, anti-inflamasi, anti-kanker, anti-tumor, anti-malaria, anti-acne, anti-tuberculosis, neuroprotektif, anti-proliferasi, serta antialergi.<sup>5,6</sup>

Flavonoid dari ekstrak kulit buah manggis jika digunakan sebagai bahan dasar irigasi saluran akar perlu diuji biokompatibilitasnya. Uji biokompatibilitas merupakan uji untuk mengetahui toksisitas suatu bahan. Toksisitas suatu bahan salah satunya dilihat dari jumlah sel yang hidup. Untuk menghitung jumlah sel yang hidup digunakan uji viabilitas dengan metode MTT Assay menggunakan kultur sel fibroblas BHK-21. Oleh karena itu, peneliti ingin melakukan penelitian untuk mengetahui viabilitas sel fibroblas BHK-21 terhadap flavonoid ekstrak kulit buah manggis menggunakan metode MTT Assay. Tujuan penelitian adalah mengetahui konsentrasi flavonoid ekstrak kulit buah manggis yang mampu mempertahankan viabilitas sel fibroblas BHK-21.

## BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Bahan yang digunakan adalah ekstrak kulit manggis, kultur sel fibroblas BHK-21 dari PUSVETMA, serta media kultur berisi Eagle, Fetal Bovine Serum 10%, serta pereaksi MTT [2- (4,5- Dimethylthiazol- 2-yl ) -2, 5-diphenyl tetrazolium bromide], PBS (Phosphat Buffer Saline), DMSO (Dimethylsulfoxide), ethanol 96%, dan aquades steril. Penelitian dilakukan di Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) Surabaya.

Ekstrak kulit manggis didapatkan dengan mengekstraksi kulit buah manggis yang telah dikeringkan dengan metode maserasi menggunakan pelarut ethanol 96%. Flavonoid dari ekstrak kulit buah manggis diisolasi menggunakan pelarut aseton benzene. Ekstrak kemudian dilarutkan dengan aquadest steril hingga didapatkan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.56%, 0.78% dan 0.39%. Uji viabilitas menggunakan MTT Assay, terdiri dari 12 kelompok yaitu kontrol media, kontrol sel, kontrol ekstrak, perlakuan pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.56%, 0.78% dan 0.39% dengan besar sampel sebanyak 8 yang ditanam pada *microplate* 96 well. *Microplate* diinkubasi pada suhu 37°C, selama 24 jam. Setelah diinkubasi, media sel dibuang, kemudian dicuci dengan PBS, diganti dengan media yang baru dan MTT ditambahkan secara langsung pada *microplate* sebanyak 10 µl. Kemudian diinkubasi kembali selama kurang lebih 4 jam pada suhu 37°C, Selanjutnya seluruh media dalam sumuran dan bahan uji diambil. Setelah itu, setiap sumuran ditambahkan DMSO sebanyak 50 µl. *Microplate* diaduk secara mekanis dengan *Plate Shaker* selama 5 menit.

Nilai *Optical Density* kristal formazan yang terbentuk dibaca dengan cara *spektrofotometri* dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 620 nm dan presentasi sel hidup dihitung dengan rumus:<sup>7</sup>

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{OD perlakuan} - \text{OD kontrol media}}{\text{OD kontrol sel} - \text{OD kontrol media}} \times 100\%$$

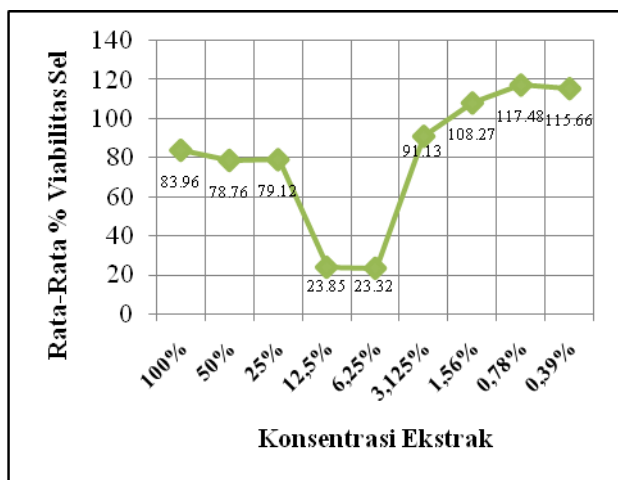
## HASIL

Hasil penelitian ini berupa hasil pembacaan dengan menggunakan *ELISA Reader* yang menunjukkan tingkatan absorbansi atau *Optical Density*. Presentase kehidupan sel dapat diketahui dari *optical density* tersebut. Presentase kehidupan sel dapat dihitung melalui rumus.

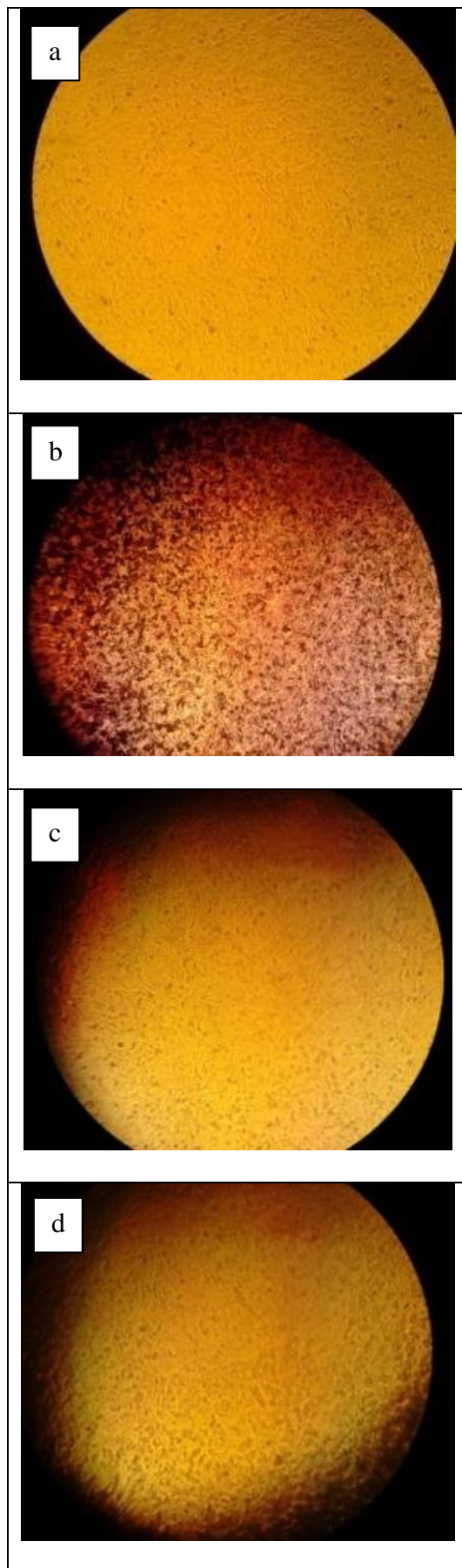
Berdasarkan hasil pengamatan dan pembacaan nilai absorbansi uji viabilitas flavonoid ekstrak kulit manggis pada sel fibroblas BHK-21 yang terbagi atas kelompok perlakuan, yaitu konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.56%, 0.78% dan 0.39%, dimana pada masing-masing kelompok perlakuan dilakukan 8 replikasi perlakuan, maka didapatkan hasil yang dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Nilai rerata *Optical Density* dan viabilitas flavonoid ekstrak kulit manggis

Perlakuan	Rata-rata nilai Absorban	Std. Deviation	Rata-rata Viabilitas Sel
Kontrol media	0.0742	0.014636	12.54%
Kontrol sel	0.5921	0.026702	100%
Kontrol ekstrak	0.2831	0.100289	47.82%
Ekstrak 100%	0.4971	0.037491	83.96%
Ekstrak 50%	0.4663	0.012994	78.76%
Ekstrak 25%	0.4685	0.039071	79.12%
Ekstrak 12.5%	0.1412	0.011610	23.85%
Ekstrak 6.25%	0.1381	0.013716	23.32%
Ekstrak 3.125%	0.5396	0.071777	91.13%
Ekstrak 1.56%	0.6411	0.062836	108.27%
Ekstrak 0.78%	0.6956	0.044539	117.48%
Ekstrak 0.39%	0.6848	0.046119	115.66%



**Gambar 1** Grafik rata-rata viabilitas sel fibroblas BHK-21.



**Gambar 2.** Pengamatan sel fibroblas BHK-21 dengan mikroskop cahaya; (a) Gambar sel fibroblas sebelum diberi perlakuan, (b) Gambar sel fibroblas dengan konsentrasi ekstrak 100%, (c) Gambar sel fibroblas dengan konsentrasi ekstrak 3,125%, (d) Gambar sel fibroblas dengan konsentrasi ekstrak 0,39%.

Dari tabel 1 terlihat bahwa pada konsentrasi flavonoid ekstrak kulit buah manggis 100%, 50%, 25% memiliki nilai absorbansi tinggi. Pada konsentrasi 12.5% dan 6.25% memiliki nilai absorbansi yang rendah dengan rata-rata viabilitas yang rendah pula. Sedangkan, pada konsentrasi flavonoid ekstrak kulit buah manggis 3.125% dan 1.56% memiliki nilai absorbansi dan rata-rata viabilitas sel yang hampir sama dengan kontrol sel. Pada konsentrasi 0.78% dan 0.39% memiliki nilai absorbansi dan rata-rata viabilitas sel yang lebih tinggi dari kontrol sel yaitu 117.48% dan 115.66%.

**Tabel 2.** Hasil uji independent-T test

Perbandingan Kelompok		Hasil Independent-T Test	
		df	Sig. (2-Tailed)
Kelompok Kontrol	Ekstrak	14	0.000
	100%	12.648	0.000
	Ekstrak	14	0.000
	50%	12.648	0.000
	Ekstrak	14	0.000
	25%	12.648	0.000
	Ekstrak	14	0.000
	12,5%	9.555	0.000
	Ekstrak	14	0.000
	6,25%	10.454	0.000
	Ekstrak	14	0.073
	3,125%	8.901	0.085
	Ekstrak	14	0.062
	1,56%	9.448	0.071
	Ekstrak	14	0.000
	0,78%	11.456	0.000
	Ekstrak	14	0.000
	0,39%	11.219	0.000

Pada uji Independent-T Test apabila nilai signifikan  $< 0.05$  maka data memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol. Dari tabel 2 terlihat bahwa pada konsentrasi flavonoid ekstrak kulit buah manggis 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 0.78%, dan 0.39% memiliki perbedaan yang bermakna dengan kontrol sel dengan nilai sig. (2-Tailed)  $< 0.05$ . Sedangkan, pada konsentrasi flavonoid ekstrak kulit buah manggis 3.125%

dan 1.56% memiliki nilai sig.(2-tailed)  $> 0.05$  yang berarti bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol.

Pada konsentrasi flavonoid ekstrak kulit buah manggis 3.125% dan 1.56% tidak ada perbedaan dengan kelompok kontrol hal tersebut berarti bahwa, apabila kedua konsentrasi tersebut diaplikasikan ke sel maka akan memberikan efek yang sama dengan kontrol sel atau sel yang tidak diberi perlakuan apa-apa.

## PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian terlihat adanya perbedaan jumlah viabilitas sel fibroblas pada berbagai konsentrasi flavonoid ekstrak kulit buah manggis. Pada gambar grafik 1 terlihat ada peningkatan nilai absorbansi pada flavonoid ekstrak kulit buah manggis konsentrasi 100%, 50% dan 25%, kemudian terjadi penurunan yang sangat tajam pada konsentrasi 12,5% dan 6,25%. Pada konsentrasi 3,125% dan 1,56% nilai absorbansi menunjukkan nilai yang hampir sama dengan kontrol sel. Sedangkan pada konsentrasi 0,78%, dan 0,39% terlihat adanya peningkatan nilai absorbansi yang melebihi kontrol sel.

Flavonoid ekstrak kulit buah manggis pada konsentrasi 100%, 50% dan 25% memiliki nilai absorbansi yang cukup tinggi pada pembacaan Elisa reader, tetapi jumlah sel yang hidup rendah nampak pada pemeriksaan dengan mikroskop. Hasil mikroskop dapat dilihat di gambar 2 b terlihat banyak sekali kotoran yang berwarna gelap.

Hal tersebut dapat terjadi dikarenakan adanya kesalahan pada penyiangan flavonoid ekstrak kulit buah manggis yang masih menyisakan banyak kotoran. Kotoran dari flavonoid ekstrak kulit buah manggis dapat mengendap di permukaan *well* sebagai warna yang gelap sehingga terbaca dengan Elisa reader sebagai sel yang hidup. Ekstrak flavonoid kulit manggis yang berwarna coklat kental dan keruh beresiko tinggi dalam hamburan cahaya pembacaan *Elisa Reader*, karena prinsip dari pembacaan Elisa adalah dengan pembacaan absorbansi warna pada mikropate. Warna dari bahan ekstrak yang berwarna gelap dan keruh yang mengakibatkan adanya hasil *False Positive*.<sup>8</sup>

Hal tersebut didukung oleh penelitian yang menyatakan bahwa, senyawa polifenol terutama flavonol yang merupakan kandungan utama pada ekstrak flavonoid kulit manggis

memiliki kemampuan untuk mengadakan reaksi reduksi pada senyawa MTT. Reduksi yang terjadi pada senyawa MTT dapat menyebabkan terbentuknya kristal formazan yang dapat terbaca oleh Elisa *Reader* sebagai sel yang hidup.<sup>9</sup>

Pada konsentrasi 6,25% dan 12,5% terjadi penurunan nilai absorbansi yang sangat tajam yang menandakan adanya kematian sel fibroblas yang sangat besar. Pada kedua konsentrasi tersebut pengaruh hamburan cahaya pada pembacaan Elisa *reader* sudah tidak menjadi permasalahan, karena flavonoid ekstrak kulit buah manggis mulai terlihat bening dan jernih yang mengindikasikan sudah sedikit kotoran yang ikut terbaca. Jadi nilai absorbansi yang rendah pada kedua konsentrasi tersebut murni akibat pengaruh dari flavonoid ekstrak kulit buah manggis terhadap sel fibroblas.

Kemungkinan kematian sel tersebut dapat terjadi karena flavonoid pada dosis yang tinggi dapat bersifat toksik bagi sel yang akan menyebabkan sel pecah atau lisis dan terjadinya kematian sel. Pada penelitian ini ada senyawa lain dalam ekstrak yang tidak sepenuhnya murni flavonoid. Dari hasil identifikasi ekstrak flavonoid didapatkan kandungan senyawa lain yaitu, Xanthone 3,65%, Tanin 4,11%, serta Saponin 2,41%. Kandungan senyawa tanin dan saponin yang diaplikasikan ke sel mampu mengganggu permeabilitas dinding sel yang menyebabkan sel fibroblas pecah dan mengalami kematian.<sup>10</sup>

Nilai absorbansi pada konsentrasi 3,125% dan 1,56% memiliki nilai yang hampir sama dengan kontrol sel. Pada uji statistik dengan *Independent-T Test* terlihat nilai sig. (2-tailed) >0.05 yang berarti bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol. Tidak adanya perbedaan yang bermakna tersebut mengindikasikan bahwa tidak ada perbedaan viabilitas sel fibroblas antara kelompok kontrol dengan kedua konsentrasi tersebut. Sehingga, dapat ditarik kesimpulan bahwa pada konsentrasi 3,125% dan 1,56% flavonoid ekstrak kulit manggis mampu mempertahankan viabilitas sel fibroblas BHK-21. Kemampuan sel untuk bertahan hidup dapat diartikan sebagai tidak hilangnya metabolik atau proliferasi dapat bertahan diukur dari bertambahnya jumlah sel, naiknya jumlah protein, atau jumlah DNA yang disintesis.<sup>11, 12</sup>

Kemampuan flavonoid mampu mempertahankan viabilitas sel didukung teori yang menyatakan bahwa flavonoid jenis tertentu pada kulit manggis mampu mengaktivasi  $Ca^{2+}$  pada mitokondria yang membuat sel mampu memproduksi ATP sehingga mampu bertahan hidup.<sup>13</sup> Selain itu flavonoid memiliki fungsi mencegah presipitasi, kerusakan sintesis sel, denaturasi protein, kerusakan metabolisme sel.<sup>14</sup>

Pada konsentrasi flavonoid ekstrak kulit buah manggis 0,78%, dan 0,39% terjadi peningkatan nilai absorbansi pada Elisa *reader* dan viabilitas sel fibroblas yang melebihi kontrol sel. Adanya peningkatan tersebut menandakan adanya proliferasi sel fibroblas BHK-21. Hal tersebut dapat terjadi karena, menurut teori yang ada menyebutkan bahwa flavonoid mampu meningkatkan kerja *Transforming Growth Factor-beta 1* (TGF-  $\beta$  1) yang merupakan faktor utama untuk merangsang proliferasi fibroblast.<sup>15</sup>

Maka dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada ekstrak flavonoid kulit buah manggis yang diaplikasikan pada sel fibroblast BHK-21 dengan metode MTT *assay* dan pembacaan ELISA *reader* absorbansi mampu mempertahankan viabilitas sel pada konsentrasi 3.125% dan 1.56%.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Grossman, Endodontic Practice. 12<sup>th</sup> ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2010, p.98.
2. Harty. Endodontic in clinical practice. 6<sup>th</sup> ed. USA: Elsevier limited. 2011, p. 102.
3. Farren ST, Sodium Hypochlorite Chemical Burn, New York State. 2008, Det. J, 74 (1); p. 61-2.
4. Cushine, T.P Tim and Andrew, J. Lamb. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005. 26: 343–356.
5. Ngawhirunpat, T., Opanasopi, P., Sukma, M., Sittisombut, C., AtsushiKat, dan Adachi, I. Antioxidant, Free Radical-Scavenging Activity and Cytotoxicity of Different Solvent Extracts and Their Phenolic Constituents from The Fruit Hull of Mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Pharmaceutical Biology*. 2010. 48 (1): 55–62
6. Palakawong, C., Sophanodora, P., Pisuchpen, S., dan Phongpaichit. Antioxidant and Antimicrobial Activities

- of Crude Extracts from Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Parts and Some Essential Oils. *International Food Research Journal*. 2010. 17: 583-9
7. Fresney RI, Culture of animal cell. A manual Basic of Technique nad Specialized applications 6<sup>th</sup> ed. New Jersey. John Wiley and Sons. Inc. 2010. p. 1-8, 111-4, 187-206, 365-377.
  8. Yeap SK, Ho WY, Beh BK dan Alitheen NB, Dose dependent contradicting immunoploriferative effect of curcumin in MTT assay. Selangor. J Contradicting Result Sel. 2012, Vol. 1 (1). P. 5-8.
  9. Han L, Okamoto A, Fukushima M, Okiji T. Evaluation of flowable resin composite surface eroded by acidic and alcoholic drinks, Dent Mater J, 2012. Vol 27, no. 3, p 455-465.
  10. Sztalryd C, Functional compensation for adiposed differentiation related protein (ADFP) by fip47 in an ADFP Null embryonic. The journal of Biological Chemsitry. 2006. Vol. 281(45); p. 34341-34348.
  11. Soenartyo H. dan Rianti D., Uji sitoksisitas ekstrak *Coleus amboinicuc*. *Lour* menggunakan MTT sesi. Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal). 2003. 36 (2).
  12. Dirix, Pitt, Efficacy of BioXira dry mouth care system in the treatment of radiotherapy-induced xerostomia. Support Care Cancer (2007), 2006. 15: 1429-1436
  13. Lee, Yo ontae. Jeon, Kip young. Lee, Jun-Tae. Kim, Sunyoung and Kim, V. Narry. MicroRNA maturation: stepwise precessing and subcellular localization. The BMBO Journal. 2002. Vol. 21 No. 17. Pp. 4663-670.
  14. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of intervention studies. Am J Clin Nutr; 2005. 81: 243S-255S.
  15. Klass BR, Branford OA, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The effect of epigallocatechin-3-gallate, a constituent of green tea, on transforming growth factor-beta1-stimulated wound contraction. *Wound Repair Regen*; 2010.18(1):80-8.